

**Über verschiedene Trockenpulver aus
Taubenleberhomogenat und ihren
aktivierenden Einfluß auf die Fettsäuresynthese**

Dietrich Kasulke

1960

Aus der
medizinischen Poliklinik der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. W. Seitz

Über verschiedene Trockenpulver aus
Taubenleberhomogenat und ihren aktivierenden
Einfluß auf die Fettsäuresynthese

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
vorgelegt von

Dietrich Kasulke
aus Bärwalde/Pommern

München 1960

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Referent: Prof. Dr.med. W. Seitz

Dekan: Prof.Dr.phil.nat.Dr.med. H. Eyer

Tag der mündlichen Prüfung: **20. Dez. 1960**



Inhaltsverzeichnis

A.	<u>Einleitung</u>	
	Vorbemerkungen über die Fettsäuresynthese und Problemstellung der Arbeit	5
B.	Übersicht bisheriger Forschung über die Biosynthese der Fettsäuren	6
C.	<u>Eigene Untersuchungen</u>	
a.	Grundversuch der Fettsäuresynthese in vitro mit radioaktiv markiertem C^{14} -Acetat	12
b.	Fördernde und hemmende Faktoren der Fettsäuresynthese	17
c.	Die verschiedenen Trockenpulver aus Taubenleberhomogenat und ihre Darstellung	18
d.	Die Wirksamkeit der einzelnen Trockenpulver sowie Vergleiche zwischen flüssigem Taubenleberhomogenat und den daraus gewonnenen Trockenpulvern	24
e.	Bestimmung des ATP-Gehalts im Trockenpulver und Abhängigkeit davon in Bezug auf die Fettsäuresynthese	28
D.	<u>Diskussion und Kritik der Versuchsergebnisse</u>	33
E.	<u>Zusammenfassung</u>	37
F.	<u>Literaturangaben</u>	40

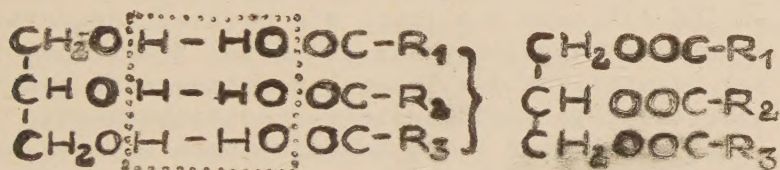


Digitized by the Internet Archive
in 2026

A. Einleitung

Vorbemerkungen über die Fettsäuresynthese und Problemstellung der Arbeit

Die Synthese der Neutralfette aus ihren beiden Bausteinen: Carbonsäuren und Glycerin erfolgt durch Veresterung der Hydroxylgruppen des Glycerins entsprechend der Reaktionsgleichung:



Der Bedarf an Fettsäuren wird im menschlichen Organismus durch die Nahrungszufuhr oder die vorhandenen Fettdepots gedeckt. Darüberhinaus vermag die Leber durch Umwandlung von Kohlehydraten Fettsäuren aufzubauen. Zu dieser Fettsäuresynthese sind selbst Abbauprodukte der Proteine befähigt, die durch ihren Abbau über die Aminosäuren zum Acetyl-Coenzym A den einen Grundbaustein liefern können. - Der zweite Baustein der Neutralfette, das Glycerin - ein dreiwertiger Alkohol, - stammt entweder ebenfalls aus der zugeführten Nahrung, oder zu einem nicht unbeträchtlichen Teil aus dem intermediären Stoffwechsel.

Interessant ist die Tatsache, daß die Bildung von niederen Fettsäuren mit entsprechend niedrigem Schmelzpunkt selbst anaeroben Mikroben wie zum Beispiel dem *Clostridium kluyveri* gelingt.

In der vorliegenden Arbeit wird über die Bio-

synthese der Fettsäuren berichtet, im besonderen jedoch über Faktoren, die aus Taubenleber präpariert, durch Acetonfällung zu Trockenpulver verarbeitet wurden und einen fördernden Einfluß auf die Fettsäuresynthese ausüben.

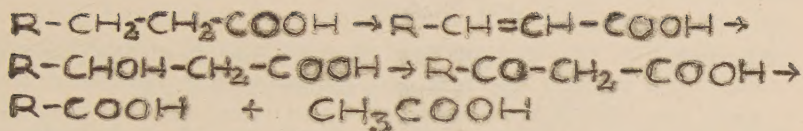
Die Biosynthese der Fettsäuren in vitro soll beschrieben werden. Als Ausgangssubstrat diene Cl^{14} Natriumacetat, aus dem mit Hilfe einer wasserlöslichen Fermentpräparation aus Taubenleber höhere Fettsäuren synthetisiert wurden.

Die Menge der synthetisierten markierten Fettsäuren wurde durch Messung der Radioaktivität im GEIGER-Zählrohr bestimmt. Die Herstellung verschiedener Trockenpulver, aus einzelnen Fraktionen bei der Darstellung des Taubenleberhomogenats gewonnen, und ihre synthesessteigernde Wirksamkeit - bei konstanten Versuchsbedingungen - wird beschrieben und diskutiert.

B. Übersicht bisheriger Forschung über die Biosynthese der Fettsäuren

Die ältesten, wissenschaftlich fundierten Fettuntersuchungen führte CHEVREULS durch, der als erster die Verseifung beschrieb. - BERTHELOT (1827-1907) gelang es, einfache Fette und Öle durch Erhitzen von Glycerin und Fettsäuren bei 300°C zu synthetisieren.

Erst die bahnbrechenden Untersuchungen FRANZ KNOOPS über den Abbau der Fettsäuren durch die β -Oxydation wiesen den Weg, der auch für die Synthese der Fettsäuren richtungsgebend war. (Die Reaktionen sind unter bestimmten Bedingungen reversibel). Schematisch wäre die β -Oxydation folgendermaßen zu schreiben:



Die Kohlenstoffketten der Fettsäuren werden aufgespalten, die C₂ Bruchstücke münden in den allgemeinen Oxydationsweg, in den Zitronensäurezyklus. Da der Start beim Fettsäureabbau eine endergonische Reaktion ist, wird Adenosintriphosphorsäure (ATP) benötigt, denn die Fettsäure muß zuerst "aktiviert" werden, d.h. mit Coenzym A unter Bildung des energiereichen Acylderivats reagieren. Die einzelnen Stufen des Fettsäureabbaus werden durchlaufen, bis schließlich die beiden Spaltstücke - also Essigsäure und die um zwei C Atome verkürzte Fettsäure in "aktiver" Form erscheinen - nämlich in Form der Thioester des Coenzym A.

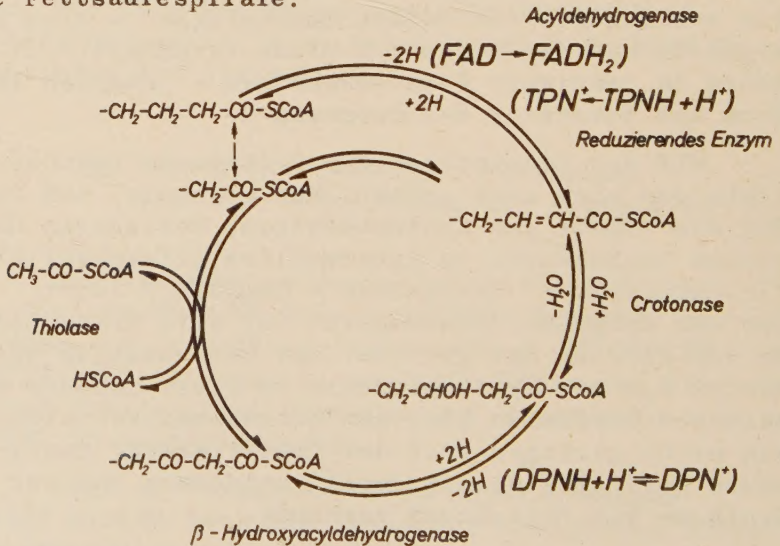
Mit der Biosynthese der Fettsäuren beschäftigte man sich erst später. Man erkannte, daß der Weg des Abbaus von Kohlenhydraten, Fettsäuren und vielen Aminosäuren im Intermediärstoffwechsel über die "aktivierte" Essigsäure = CH₃COSCoA führt. Der nun folgende Abbauweg ist für alle diese Stoffe von hier an der gleiche: die Kondensation des Acetyl-CoA mit Oxalessigsäure zu Zitronensäure und weiterer Oxydation über den Zitronensäurezyklus. Ein nicht geringer Teil der "aktivierten" Essigsäure wird aber diesem "pool" entnommen und zur Synthese von Fettsäuren verwandt.

Es ist das Verdienst von LYNEN, aufgezeigt zu haben, daß die Fettsäuresynthese durch die Wiederholung eines Kreislaufs von vier aufeinanderfolgenden Reaktionen zustande kommt.

- Schritt I Es kommt zur Kondensation von zwei Molekülen Acetyl-C₀A zu Acetoacetyl-C₀A und C₀A-SH
- Schritt II Es folgt die Reduktion des Acetoacetyl-C₀A zu β-Hydroxybutyryl-C₀A,
- Schritt III dieses wird zu Crotonyl-C₀A dehydratisiert und schließlich wird im
- Schritt IV das Crotonyl-C₀A zu Butyryl-C₀A reduziert.

Nach achtmaligem Durchlaufen dieses Zyklus ist Palmitinsäure gebildet.

LYNEN stellte für die Synthese - und für den Abbau - folgendes Schema auf:
die Fettsäurespirale.



Die Hypothese, daß die Synthese von Fettsäuren einer Umkehrung des Abbaus entspricht, konnte hiermit bewiesen werden. Nur an einer Stelle der Fettsäurespirale ist der Wirkungsmechanismus ein

anderer. SEUBERT und LYNEN wiesen darauf hin, daß beim Syntheseweg an die Stelle der Acyldehydrogenase ein neugefundenes Ferment tritt, sie nannten es das "reduzierende Enzym des Fettsäurezyklus". Beide Autoren konnten aufzeigen, daß dieses Enzym den Wasserstoff vom reduzierten Coferment (TPNH) auf das α , β -ungesättigte Acyl- C_0A überträgt. Nur an dieser Stelle, nämlich an der Bildung der α , β -ungesättigten C_0A -Verbindung bzw. deren Hydrierung zum gesättigten Acyl- C_0A unterscheiden sich die einzelnen Schritte von Abbau und Aufbau in der Fettsäurespirale.

Sicher spielt im Fettsäurezyklus auch die Transhydrogenase (nach KAPLAN) eine entscheidende Rolle, da sie zwischen den beiden Pyridincofermenten die Wasserstoffübertragung katalysiert:



LYNEN und Mitarbeitern gelang die Isolierung und Identifizierung der übrigen Schlüsselenzyme des Fettsäurestoffwechsels. Zu dem gereinigten, künstlich zusammengestellten Enzymsystem des Fettsäurezyklus gehören nach SEUBERT: Thiolase, β -Hydroxyacyldehydrogenase und Crotonase.

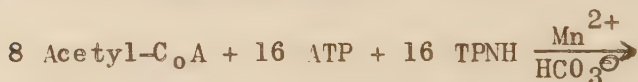
BRADY und GURIN benutzten als erste 1952 ein wasserlösliches Enzymsystem von Taubenlebern, das unter anaeroben Bedingungen Acetat in Fettsäuren umwandeln konnte; unter Bedingungen, die keine oder nur eine äußerst geringe Fettsäureoxydation erlauben. Die Autoren zeigten, daß zum Einbau von Acetat in lange Fettsäureketten nicht nur die Anwesenheit eines acetataktivierenden Enzyms notwendig ist, sondern auch die Glykolyse obligat sei.

BRADY und Mitarbeiter konnten die Fettsäuresynthese durch Zugabe von Zitrat verstärken. Es lag

nahe, eine Beziehung der Reaktion mit der TPNabhängigen Isocitricodehydrogenase anzunehmen:



Daß ebenfalls ein anderer Weg, als der von LYENEN beschriebene, zur Fettsäuresynthese führt, bewiesen GIBSON und WAKIL. Aus wasserlöslichen Enzymfraktionen von Vogellebern, die nur Spuren der reversibel arbeitenden Fermente der Fettsäureoxydation und überhaupt kein "reduzierendes Enzym" enthielten, konnte nach Zugabe von ATP, Acetyl-C₀A, Manganionen, Bicarbonat und TPNH die Bildung von Fettsäuren festgestellt werden. GIBSON konnte diesen Prozeß spektrophotometrisch verfolgen:



Schließlich verwandten TIETZ u. WAKIL Hühner- und Rattenleberhomogenate, die als "gereinigte Enzymsysteme" durch hochtouriges Zentrifugieren gewonnen wurden. Es zeigte sich jedoch, daß die Synthesefähigkeit und Ausbeute an Fettsäuren durch Verwendung von Rattenleberhomogenat weitaus geringer war, als beim Einsatz von Hühnerleberhomogenat. Selbst durch Zufuhr von Cofaktoren wie Cystein und Glutathion konnten keine signifikanten Steigerungen der Synthese erreicht werden.

Da in den Lebermitochondrien der Fettsäureabbau stattfindet, hofften BRADY und GURIN durch Acetonfällung ein Trockenpulver aus Mitochondrien herzustellen, das möglicherweise die Bildung der Fettsäuren aktiviert. Ob die Fettsäuresynthese einzig und allein im löslichen Anteil der Leber-

zellen stattfindet - wie später von einigen Autoren angenommen wurde - oder auch in den Mitochondrien, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Immerhin behielt das von BRADY und GURIN produzierte Trockenpulver in einer Suspension von "supernatant" (s. später) etwa eine Stunde lang seine volle Aktivität.

1958 konnten CATRAVAS u. ANKER aus Ratten- und Schweineleberextrakten eine zellfreie Substanz isolieren, der sie den Namen "Lipogenin" gaben. Dieses Lipogenin vermag die daniederliegende Fettsynthese bei hungernden Ratten wieder zu aktivieren und übt gleichzeitig einen Einfluß auf die Blutzucker-Konzentration im Sinne einer Erniedrigung aus.

Unabhängig davon veröffentlichte v. BRAND kurz vor den genannten Autoren eine Mitteilung über einen die Fettsäuresynthese steigernden "Faktor", der aus Taubenleber gewonnen wurde. Der in Phosphat-Bicarbonat-Puffer aufgenommene Faktor an Stelle des Enzyms mit den üblichen Cofaktoren in den Versuch eingesetzt, ergibt selbst keine Fettsäuresynthese. Dagegen konnte die Ausbeute an synthetisierten markierten höheren Fettsäuren eines normalen Versuchsansatzes durch Zugabe des im Leerwert unwirksamen Faktors um etwa 50 % gesteigert werden. Darstellung und möglicher Wirkungsmechanismus des Faktors wurden von SCHREIER beschrieben.

Die vorliegende Arbeit ist eine Fortsetzung der experimentellen Versuche auf dem Gebiet der Faktorforschung; es werden Herstellung und Anwendung von Trockenpulvern aus Taubenleberhomogenat besprochen und die Beziehungen zur Fettsäuresynthese dargelegt.

C. Eigene Untersuchungen

- a. Grundversuch der Fettsäuresynthese in vitro mit radioaktiv markiertem C^{14} -Acetat
- aa. Gewinnung des löslichen Fermentsystems aus Taubenleber

Drei bis vier, mit Weizenkörnern gut ernährte Tauben werden mittels Scherenschlag dekapitiert, nach Laparatomie werden die Lebern in toto entfernt und in Eiswasser gelegt. Anschließend werden sie von Fett und Bindegewebe befreit, in kleine Stücke geschnitten und gewogen. Das Lebergewicht ($=x$) wird mit 1,2 multipliziert. Die erhaltene Zahl entspricht der zuzuführenden Puffermenge in ml, in der die kleinen Leberstücke mittels POTTER-ELVEH-JEM-Homogenisator zu einer breiigen Emulsion verarbeitet werden. Diese Emulsion wird 45 Minuten bei 2000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Anschließend wird die überstehende Flüssigkeit dekantiert, der Rückstand wird verworfen. Das Lebergewicht ($=x$) wird jetzt mit $4/3$ multipliziert, die gefundene Zahl entspricht den ml, die zum Auffüllen mit Puffer der durch das Zentrifugieren erhaltenen klaren Flüssigkeit dienen. Die Mischungsverhältnisse wurden durch entsprechende Vorversuche als optimal herausgearbeitet.

Es folgt - in Polyamidzentrifugengläschen - ein zweites, eineinhalbstündiges Zentrifugieren bei 25 000 x g (Runne-Zentrifuge-Heidelberg). Man erhält danach folgendes Bild:



← Überstand oder SUPERNATANT, der das lösliche Enzymsystem erhält.

← Geleeartiger Rückstand, dient zur Präparation des FAKTORS

Beispiel :

- 36,3 = gewogenes Lebergewicht in g = x
 43,6 = $x \cdot 1,2$; in dieser Menge Puffer wird die zerkleinerte Leber aufgenommen und homogenisiert
 48,4 = $x \cdot 4/3$; nach dem 1. Zentrifugieren wird der Flüssigkeitsüberstand bis zu dieser Zahl mit Puffer aufgefüllt (in ml.).

Voraussetzung für vergleichbare, exakte Ergebnisse ist das strikte Einhalten einer Temperatur von 0°C bei den angegebenen Arbeitsprozessen: von der Säuberung der Leber in Eiswasser, über eisgekühlte Homogenisierung bis hin zur Zentrifugierung in einer Kühltruhe bei 0°C.

Die angegebenen Zahlen, mit denen das Lebergewicht multipliziert wird, wurden in längeren Versuchsreihen gefunden und haben sich - empirisch betrachtet - als zweckmäßig erwiesen. Zur Aufrechterhaltung eines bestimmten pH-Wertes, der ja auch im lebenden Organismus Bedingung für alle ablaufenden Stoffwechselvorgänge ist, wird Puffer zugesetzt. Die Zusammensetzung des Puffers ist folgende:

81,8 ml	m/15		Na_2HPO_4
18,2 ml	m/15		KH_2PO_4
0,7 g			KHCO_3

bb. Fettaufbau im Warburg-Apparat

In ein Warburgkölbchen von 25 ml Inhalt werden zu jedem Versuchsansatz folgende konstante Zusätze einpipettiert:

0,1 ml 0,006 m $MgCl_2$	dient als Coferment
0,1 ml 0,01 m Citrat	greift in den Zitronensäurezyklus ein
0,4 ml 0,008 m C^{14} Acetat ^{x)} ...	dient als Ausgangssubstrat für die Fettsäuresynthese und zur radioaktiven Markierung

Als inkonstante Zusätze kommen pro Versuchsansatz noch 2,2 oder 2,3 ml frisch bereiteten Supernatants, als des eigentlichen, löslichen Enzymsystems hinzu. Durch die Beifügung von 0,1 ml Faktor, oder von entsprechender Menge Trockenpulver (s.später) oder von anderen auszutestenden Stoffen kann dann ein fördernder oder hemmender Einfluß auf die Synthese der Fettsäuren festgestellt werden. Die Gesamtmenge in einem Warburgkölbchen betrug 3,0 ml. Zehn bis zwölf solcher Kölbchen - versehen mit den verschiedenen Zusätzen in verschiedenen Konzentrationen - werden in das Wasserbad der Warburg-Apparatur einge-

^{x)} Das Isotop $^{6}C^{14}$ ist ein β Strahler mit einer Halbwertszeit von 5590 Jahren, es wurde zu allen durchgeführten Versuchen benutzt und als "sodium-acetate by freeze dried salt" mit einer spezifischen Aktivität zwischen 18,4 μ C/mg und 27,6 μ C/mg $CH_3C^{14}OONa$ vom "Radiochemical Centre" aus Amersham, Buckinghamshire, England, bezogen.

hängt. Dort werden die Kölbchen nach einer zehn Minuten dauernden Begasung mit Argon unter anaeroben Bedingungen (oder mit CO_2) sowie bei einer konstanten Temperatur von 38°C drei Stunden lang inkubiert.

Beim Einsetzen von C^{14} -Acetat als Substrat der Synthese konnte v. BRAND beim Einbau in höhere Fettsäuren eine Ausbeute von 19-31 % verzeichnen. Durch chromatographische Analysen zeigte sich, daß die synthetisierten mit C^{14} markierten höheren Fettsäuren vornehmlich aus Palmitinsäure (zu 40 %), aus Stearinsäure (zu 20 %) und aus Ölsäure (zu 35 %)(8) bestehen. Den Rest (5 %) bilden Kaprin-, Laurin- und Myristinsäure. Interessant zu bemerken ist, daß die in vitro gebildeten Fettsäuren qualitativ praktisch im gleichen Verhältnis zueinander stehen wie im natürlichen Fett der Taubenleber.

cc. Verseifung und Gewinnung der Fettsäuren

Nach dreistündiger Inkubation wird der Inhalt der Warburgkölbchen mit alkoholischer KOH unter Zugabe von 25 mg inaktiver Palmitinsäure als Träger-substanz 4 Stunden am Rückflußkühler verseift. Die Fettsäuren liegen dann als Kaliumsalze vor. Nach der Verseifung und nach dem Abkühlen der Verseifungskölbchen wird deren Inhalt in Scheidetrichter umgefüllt. Die Verseifungskölbchen werden mit Petroläther ausgespült und die Scheidetrichter etwa bis zur Hälfte mit Petroläther aufgefüllt. Dazu werden vier Tropfen Bromkresylgrün/Methylrot als Indikator gegeben. Durch das Hinzufügen von 12 % HCl - bis ein Farbumschlag nach rot eintritt - werden die freien Fettsäuren gebildet.

Jeder Scheidetrichter wird intensiv geschüttelt und kurz stehen gelassen. Im klaren Überstand

sind die Fettsäuren im Petroläther gelöst. Der Überstand wird abgeschieden und auf dem kochenden Wasserbad eingedampft. Der verbliebene Rückstand wird noch dreimal mit Petroläther extrahiert und abgeschieden, sodaß sich nach diesem Prozeß keine Fettsäure mehr im Rückstand befindet. Nach dem vorsichtigen Verdampfen des Petroläthers bleiben in den Bechergläsern die Fettsäuren zurück, sie werden mit Petroläther aufgenommen und auf 10,0 ml aufgefüllt. Anschließend wird aus jeder Probe auf eine Aluminiumfolie (s. Abbildung) von 25 mm Durchmesser mit Rand, auf der sich ein Plättchen aus Lens-paper (zu beziehen durch die Firma Rodenstock) befindet, zweimal je 0,5 ml Lösung mittels Pipette aufgetropft. Vor der Messung der Aktivitäten muß auf den Plättchen der Petroläther an der Luft verdampft sein. Es werden von jeder Probe vier Plättchen gegossen.



Aluminiumfolie in Aufsicht



Aluminiumfolie im Querschnitt
mit Lens-paper

dd. Messung der Aktivitäten

Im GEIGER-MÜLLER-Zählrohr^{x)} erfolgt die Messung der Radioaktivität nach der direkten Methode von ENTENMAN und Mitarbeitern. Die Aktivität wird in Impulsen pro Minute für Gesamtfettsäuren angege-

^{x)} Es wurden zu Meßzwecken ausschließlich Geräte der Firma: Friesseke u. Hoepfner, Erlangen, benutzt.

ben. (z. B. bei 25000 Impulsen = $2,5 \cdot 10^4$ J/min.) Vor jeder Messung ist die Arbeitsspannung von 1,4 kV zu kontrollieren, es muß der Null- oder Leerwert der Luft bzw. des Apparates festgestellt werden. Alle Werte werden auf einen Folienmittelwert einer Standardfolie, die stets mitgemessen wird, umgerechnet, um die Resultate vergleichen zu können.

b. Fördernde und hemmende Faktoren der Fettsäuresynthese

Der beschriebene Grundversuch dient als sog. Nullwert der Fettsäuresynthese für alle folgenden Versuche. Die Problemstellung bei den nachfolgenden Fettsäuresynthese-Versuchen war die Frage: durch welche Zusätze kann man eine Förderung respektive eine Hemmung der Synthese im Vergleich zur Ausgangsaktivität erreichen?

Daß gewisse Cofermente die Synthesefähigkeit beeinflussen können, erkannten schon BRADY und GURIN, die Magnesium-Ionen, Citrat, DPN und Cytochrome als aktivierende und Calcium- und Fluor-Ionen u. a. als hemmende Faktoren in ihre Versuche einsetzten.

Als weitere Aktivatoren der Fettsynthese wurden: ATP, TPN, Coenzym A und Mangan-Ionen gefunden.

Als Inhibitoren wirken u. a. Arsen-Ionen, Avidin, verschiedene Gallenbestandteile und Nikotinsäureamid. Wichtig zu bemerken ist ferner, daß die hemmenden und fördernden Eigenschaften vom pH-Wert und vor allem von der Konzentration der zugeführten Substrate abhängig sind. So können z. B. kleine Mengen von Coenzym A die Ausbeute an synthetisierten markierten Fettsäuren steigern, größere Mengen aber hemmend wirken, weil sie eine thiolytische

Spaltung der gebildeten Fettsäuren begünstigen.

Weiterhin ist die Höhe der Fettsäuresynthese von dem Gasmilieu abhängig. Die Ausbeute an markierten, synthetisierten Fettsäuren ist in CO_2 -Atmosphäre höher, wie v. STETTEN nachwies, als im aeroben Milieu.

Schließlich versuchten BRADY und GURIN zur Leistungssteigerung des Systems den Zusatz eines Trockenpräparates aus Mitochondrien. V.v. BRAND u. W. SEITZ konnten aus einer Mitochondrien-Fraktion der Taubenleber einen Faktor präparieren, der bei geeigneter Präparation einen fördernden Einfluß auf die Höhe der Fettsäuresynthese des löslichen fettsäure-synthetisierenden Enzymsystems aus Taubenleber hat. SCHREIER beschrieb diesen Faktor, der nicht mit ATP identisch ist und dessen Absorptionskurve zwischen 258 bis 260 μ ein Maximum zeigt. Er steigert die normale Synthese wie auch diejenige von Hungertaubensupernatant in signifikanter Weise (50 %). Eine experimentelle Fortsetzung zur weiteren Klärung des Faktors bedeutend im nächsten Abschnitt beschriebenen Versuche zur Darstellung von Faktor-Trockenpulvern.

c. Die verschiedenen Trockenpulver aus Taubenleberhomogenat und ihre Darstellung

Es gibt verschiedene Arten der Konservierung von organischen Stoffen, deren spezifische Wirksamkeit erhalten bleiben soll. Einen großen Raum auf diesem Gebiet nimmt die Kältetrocknung ein. Ob sie nun mit Kohlensäureschnee oder mit

Eis - Kochsalzlösung vorgenommen wird, hängt von den jeweiligen Erfordernissen ab. Von großer Wichtigkeit ist, daß die meist leicht verderblichen Produkte nach dem Trockenprozeß bei ihrer Rückführung in den ursprünglichen, löslichen Zustand nichts oder kaum etwas von ihrer Wirksamkeit verloren haben. - Der Grund, ein Trockenpulver des aktivierenden Faktors zu präparieren, war die Tatsache, daß frisch hergestellte, wirkungsvolle Faktoren schon nach einigen Tagen ihre aktivierende Fähigkeit verloren.

Die Herstellung des Faktors verläuft folgendermaßen: Die Taubenlebern werden, wie auf Seite 12 angegeben, verarbeitet. Nach dem zweiten, neunzigminutenlangen Zentrifugieren wird der Supernatant aus den Polyamidzentrifugengläschen abgegossen und der Rückstand - eine gelbliche, geleeartige Masse - mit dem Spatel ausgekratzt und in ein Reagenzglas übergeführt. Dieses wird im kochenden Wasserbad 15-30 Minuten erhitzt, der an der Wandfläche des Glases völlig getrocknete Rückstand wird danach wieder in Phosphat-Bicarbonat-Puffer aufgenommen und homogenisiert. Die Menge des zugeführten Puffers ist verschieden; einen Anhalt bietet jedoch - unter Heranziehung des Beispiels über die Leberverarbeitung auf Seite 13 - die dritte Zahl vom Lebergewicht ausgehend. Sie wird durch drei dividiert und das Ergebnis daraus mit 0,1 multipliziert. Wollten wir bei dem auf Seite 13 angeführten Beispiel aus dem Sediment nach dem zweiten, höchsttourigen Zentrifugieren einen Faktor präparieren, so ergäbe das folgende Rechnung:

$$\begin{array}{rcl} 48,4 : 3 & = & 16,13 \\ 16,13 \cdot 0,1 & = & 1,6 \end{array}$$

Man würde den erhitzten und getrockneten Rückstand in diesem Fall zweckmäßigerweise in etwa 2,0 ml Puffer aufnehmen und homogenisieren. Das gewonnene

Substrat wird "Faktor" genannt und vermag in einer Menge von 0,1 ml die Fettsäuresynthese eines sog. Normalansatzes bis zu 50% zu steigern.

Aus diesem flüssigen Faktor, dessen aktivierende Fähigkeit jeweils getestet wird, präparierten wir ein Acetontrockenpulver. Die zu fällende Vorlage des Faktors wird in die zehnfache Menge tiefgekühlten Acetons (Eis-Kochsalz-Mischung) unter ständigem Rühren tropfenweise eingegossen. Der Faktor fällt in feinem, sich leicht am Boden absetzenden Niederschlag aus; das Gemisch wird zur Vollständigkeit der Fällung noch eine Stunde im Eisschrank belassen. Danach wird der klare Überstand abdekantiert und der Rest 10 Minuten bei 2000 U/min in der Kälte abzentrifugiert. Nach Beendigung des Zentrifugierens wird der Acetonüberstand vorsichtig mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Sediment mit etwa dem gleichen Quantum frischen Acetons gewaschen und noch einmal 10 Minuten bei gleicher Umdrehungszahl zentrifugiert. Nach diesem zweiten Zentrifugieren wird der Acetonüberstand wiederum abgesaugt und das Sediment mit einem Spatel aus dem Glas entfernt und auf einer Petrischale ausgebreitet. Das Produkt wird in einem Exsikkator getrocknet. Bereits nach 6-12 Stunden ist das "Sediment" so trocken, daß es im Achat-Mörser pulverisiert werden kann. Die gewonnene Pulvermenge wird gewogen und die Ausbeute in Relation zum verarbeiteten flüssigen Faktor gesetzt. Das Trockenpulver wird in gut verschließbaren Gläschen aufbewahrt und behält so über Monate die volle Wirksamkeit. Wir konnten aus 15,0 ml Faktor - gefällt in 150,0 ml Aceton - 1,5813 g F.-Trockenpulver^{x)} herstellen.

^{x)} Abkürzungen für:

Faktor-Trockenpulver = F.-Trockenpulver

Supernatant-Trockenpulver = Sup.-Trockenpulver

Hungersupernatant-Trockenpulver = Hunger-sup.-
Trockenpulver

Die Resultate des in die Versuche eingesetzten F.-Trockenpulvers werden im nächstfolgenden Abschnitt beschrieben.

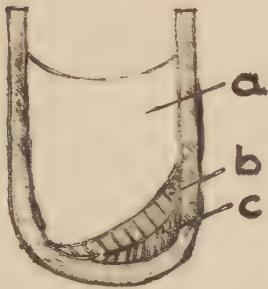
Es ist verständlich, daß wir nach den guten Erfolgen bei der Verwendung des F.-Trockenpulvers auch aus den übrigen Leberhomogenatsfraktionen

entsprechende Trockenpulver zu präparieren versuchten:

Nach dem ersten Zentrifugieren des Leberhomogenats ergibt sich folgendes

Bild: Der mit a. bezeichnete Überstand wird, wie schon auf Seite 13 beschrieben, dekantiert, mit Puffer aufgefüllt und ein zweites Mal, jetzt

jedoch eineinhalbstündig, hochtourig zentrifugiert. Die Schichten b. und c. eignen sich nicht zur Fettsynthese und werden verworfen.

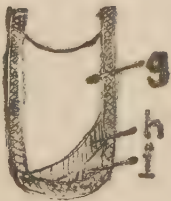


Schema nach der 2. Zentrifugation:

Der Überstand g, Supernatant genannt, enthält das eigentliche zur Synthese notwendige Enzymsystem.

Aus dem Supernatant wurde nach dem gleichen Darstellungsverfahren wie bei der F.-Trockenpulverherstellung ebenfalls ein Trockenpulver präpariert. Die Ausbeute ist im Vergleich zum F.-Trockenpulver viel geringer,

wenn man von adäquaten Mengen an Flüssigkeit ausgeht. Deswegen ist die Sup.-Trockenpulvermenge, die für einen Versuchsansatz benötigt wird, relativ hoch (120-160 mg), wenn sie dem flüssigen Supernatant (2,2 - 2,3 ml) entsprechen soll. Es zeigte sich, daß



der Einsatz von "Sup.-Trockenpulver" statt des sonst üblichen, flüssigen Enzymsystems, einen extrem hemmenden Einfluß auf die Synthese ausübt. Diese Hemmung konnte selbst nicht durch Hinzufügen von wirksamem "Faktor" behoben werden. Die beobachtete Hemmung reicht fast an die minimale Synthese heran, die bei Gebrauch eines 2-3 Tage alten, im Eisschrank aufbewahrten Supernatants zu verzeichnen war. Damit ist bewiesen, daß eine Sup.-Trockenpulver-Präparation nicht den gewünschten Anforderungen entspricht.

Die deutlich zwischen g und i befindliche Fraktion h (s. Abbildung auf S. 21) fällt in zu geringem Maße an, als daß sie zur Trockenpulver-Herstellung verwandt werden könnte. Aus dem Sediment i wird der übliche "Faktor" (s. S. 19) präpariert.

In einer längeren Versuchsreihe wurde der Überstand g = Supernatant etwa 5 Minuten über 56°C erhitzt. Das dadurch entstandene "GÜ" hat erstaunlicherweise annähernd ähnliche Eigenschaften wie der Faktor, wenn die synthesesfördernde Aktivität des GÜ auch nicht völlig an diesen heranreicht. Durch Eindicken des Überstands konnte die synthesessteigernde Fähigkeit geringgradig erhöht werden. Es lag nahe, auch aus dem GÜ mittels Acetonfällung ein Trockenpulver herzustellen, um ebenfalls eine genau dosierbare und haltbare Substanz zu gewinnen, die man als Vergleichs- oder gar als Standardwert in die Synthese einsetzen kann.

Es wird - ähnlich wie bei der Sup.-Trockenpulver-Herstellung - viel Ausgangsmaterial gebraucht, bei relativ geringer Ausbeute. Aus 15,0 ml GÜ - ausgefällt in 150,0 ml Aceton - konnten wir nicht mehr als 394,6 mg GÜ-Trocken-

pulver gewinnen. Eine Erhöhung der synthesesestei-
gernden Aktivität, wie wir sie bei Faktor bzw.
F.-Trockenpulver zugunsten des Trockenpulvers be-
obachteten, konnten wir bei dem Verhältnis zwi-
schen flüssigem GÜ und GÜ-Trockenpulver nicht fest-
stellen. Konzentriertes, also eingedicktes GÜ und
GÜ-Trockenpulver sind, in vergleichbaren Mengen
eingesetzt, ihrer Wirkung nach in der Mehrzahl der
durchgeführten Versuche fast identisch.

Von Hungertauben, die drei Tage keine Nahrung
erhielten, wurde ein "Hungersupernatant" gewonnen.
Über die Wirkungsweise desselben wird im folgenden
Kapitel berichtet. Auch aus Hungersupernatant ha-
ben wir durch Acetonfällung entsprechendes Trocken-
pulver präpariert. Aus 4,8 ml Hungersupernatant
- auf 48,0 ml Aceton - konnten wir 199,8 mg Trok-
kenpulver herstellen. Von den in die Synthese ein-
gesetzten Hunger-Sup.-Trockenpulvern waren keine
signifikanten Unterschiede zu flüssigem Hungersuper-
natant zu beobachten.

Zusammengefaßt (s. Tabelle) kann festgestellt
werden: aus den verschiedenen Leberhomogenats-
fraktionen konnten vier verschiedenartige Trocken-
pulver durch Acetonfällung (Ausgangssubstrat zu
Aceton wie 1:10) präpariert werden.

Bezeichnung der Trockenpulver Art	Relation zwischen flüssigem Ausgssubstrat und Trockenpulverausbeute	Wirkung auf die Fettsäure- Synthese	Die Präparation ist:	Erklärung im Text siehe Seite
*FAKTOR- Tr.-Pulver	1,0 ml flüss. Faktor = 105,42 mg Faktor-Trockenpulver 1 mg Faktor-Trockenpulver = 0,00949 ml flüssiger Faktor	maximal fördernd	Zweckmäßig ergiebig	24
GÜ - Tr.-Pulver	1,0 ml flüss. GÜ = 26,306 mg GÜ-Trockenpulver 1 mg GÜ-Trockenpulver = 0,0381 ml flüssiges GÜ	gering- gradig fördernd	wenig Zweckmäßig	25
HUNGER- SUPERNATANT Tr.-Pulver	1,0 ml flüss. Hungersup. = 41,625 mg Hungersup.-Trockenpulver 1 mg Hungersup.-Tr.P. = 0,02402 ml flüssiger Hungersupernatant	keine signifikante	un- Zweckmäßig	26
SUPERNATANT Tr.-Pulver	1,0 ml flüss. Sup. = 47,3 mg Supernatant-Trockenpulver 1 mg Supernatant-Tr.P. = 0,02114 ml flüssiger Supernatant	hemmend	un- Zweckmäßig	27

Die Zahlenwerte der Aufstellung geben einen Überblick über die Trockenpulvergewinnung. Es wurden mehrere Male die einzelnen Trockenpulverarten hergestellt, wobei die erhaltene Pulvermenge teils geringgradig über, teils geringgradig unter den obigen Werten blieb.

- d. Die Wirksamkeit der einzelnen Trockenpulver sowie Vergleiche zwischen flüssigem Taubenleberhomogenat und den daraus gewonnenen Trockenpulvern.

aa: Faktor-Trockenpulver

Es wurden insgesamt 95 Einzelversuche mit F.-Trockenpulver durchgeführt. Von den 95 Versuchsansätzen wurde in 68 Versuchen die Fettsäuresynthese in beträchtlichem Maße gefördert, maximal wurde der Ausgangswert der Synthese bis zu 500 % gesteigert. Dies war der Fall bei F.-Trockenpulverzusatz zu Hungertaubensupernatant. Der Durchschnittswert der Förderung liegt zwischen 150 % - 200 %. Steigerungen über 200 % sind möglich bei kombiniertem Zusatz von flüssigem Faktor und F.-Trockenpulver.

Bei 6 von diesen 95 Versuchsansätzen entsprach die Ausgangsaktivität der Synthese derjenigen mit Zusatz von F.-Trockenpulver. Dies ist daraus zu erklären, daß möglicherweise in diesen Versuchsansätzen die zugegebene F.-Trockenpulvermenge zu gering war. Es wurden in diesen Versuchen 7,5 mg F.-Trockenpulver pro Versuchsansatz zugegeben. Ein Optimum an F.-Trockenpulver ist jedoch erst bei 30 mg/Ansatz gegeben.

Schließlich erreichte in 21 von 95 Versuchen die Höhe der Fettsäuresynthese nicht den Ausgangs-

wert. Es handelte sich hier um die Verwendung des gleichen, bisher stark fördernden F.-Trockenpulvers; nur waren außer diesem in den einzelnen Versuchsansätzen gleichzeitig noch stärker hemmende Substanzen wie: Avidin oder Thioctsäure enthalten. Die Hemmung dieser Stoffe konnte vom F.-Trockenpulver nur z.T. aufgehoben werden, daher lagen in allen diesen Fällen die synthetisierten Fettsäuren unter dem Ausgangswert.

Zu den Vergleichen zwischen flüssigem Faktor und F.-Trockenpulver kann berichtet werden, daß nach eigenen statistischen Zusammenstellungen 83 % aller flüssigen Faktoren aktivierend auf die Synthese einwirken. Bei 17 % liegt die Menge der gebildeten Fettsäuren trotz flüssiger Faktorzufuhr unter der Ausgangsaktivität. Es ist anzunehmen, daß in diesen Fällen entweder das Ausgangsmaterial oder die Faktor-Präparation nicht optimal waren. genauere Angaben über die flüssige Faktorzugabe und -Wirkung beschreibt SCHREIER.

Bei alleiniger Verwendung von F.-Trockenpulver unter optimalen Bedingungen in die Synthese eingesetzt (30 mg/Zusatz, ohne gleichzeitige Anwesenheit von Hemmsubstanzen), konnten wir bei 89 % der Versuche signifikante Steigerungen der Fettsäuresynthese feststellen. Damit erwies sich das F.-Trockenpulver als bisher bester Aktivator der Fettsäuresynthese in vitro.

bb. GÜ - Trockenpulver

Mit GÜ-Trockenpulver sind nur einige Versuche durchgeführt worden. Ein Vergleich zwischen flüssigem GÜ - durch Wasserentzug eingedicktem GÜ - und GU-Trockenpulver kann nur insoweit angestellt werden, als sich die Resultate bei allen drei Zustandsformen des GÜ nur geringgradig von-

einander in ihrer Wirkung unterscheiden. Trotz der kleinen Anzahl der GÜ-Trockenpulver-Versuche kann die Aussage gemacht werden, daß etwa 33 % der experimentell gewonnenen Ergebnisse nicht wesentlich vom Ausgangswert der Fettsäuresynthese differieren. Die übrigen 67 % aktivieren die Fettsäuresynthese, wenn auch nicht in der Höhe wie beim Einsatz von F.-Trockenpulver, so doch annähernd wie beim Zusatz von flüssigem Faktor. -

cc. Hungersupernatant - Trockenpulver

Eine Gegenüberstellung von Hungersupernatant und frisch bereitetem normalen Supernatant ist wegen der extrem verschiedenartigen Wirkung beider Substanzen problematisch. Bei alleiniger Verwendung von flüssigem Hungersupernatant (zu den obligaten, konstanten Zusätzen) liegt die Synthesefähigkeit vollkommen danieder, so daß die gemessenen gebildeten Fettsäuremengen mit den Nullwerten vergleichbar sind. Selbst durch das Hinzufügen von ATP und TPN kann dieses Ergebnis nur geringfügig beeinflußt werden. Wird der Hungersupernatant zu einem Versuchsansatz mit einem Supernatant von normal ernährten Tauben hinzugegeben, so hemmt er die Synthese beträchtlich. Dagegen kann die Zufuhr von flüssigem Faktor die Hungersupernatant-Synthese erheblich (um 50 %), die Zufuhr von F.-Trockenpulver dieselbe ganz außerordentlich (um 300 % - 500 %) steigern.

Mit einem Faktor aus Hungersupernatant präpariert, konnte niemals eine Fettsäuresynthese-steigernde Wirkung erzielt werden. Desgleichen beobachteten wir bei der Herstellung von Hunger-Sup.-Trockenpulver, daß dieses - in die Synthese eingesetzt - im Höchstfall den Wert der Ausgangsaktivi-

tät erreichte - ihn aber nie überschritt. -

dd. Supernatant - Trockenpulver

Als letztes der vier präparierten Trockenpulverarten sei der Wirkungsmechanismus des Trockenpulvers besprochen, das aus normalem, frisch bereitetem Supernatant gewonnen wurde. Da flüssiger, über 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrter Supernatant seine fettsäuresynthese-steigernde Aktivität verliert, versuchten wir, um möglicherweise ein stets vergleichbares Präparat einsetzen zu können, größere Mengen frischen Supernatants als Trockenpulver zu gewinnen. Wir hofften, die Eigenschaften des flüssigen Supernatants durch den Trockenprozeß zu erhalten. Leider erzielten wir in diesen Versuchen keine positiven, gewünschten Resultate. Genau 75 % unserer Sup.-Trockenpulver-Experimente hemmten die Synthese eindeutig. In 25 % der Versuche erreichten die synthetisierten Fettsäuren kaum die Werte der Ausgangsaktivität (mit flüssigem, gleichem Supernatant), oder aber gerade den Leerwert, wenn das Sup.-Trockenpulver statt in Puffer in aqua-bidestillata gelöst wurde.

Bei einer vereinfachten, zusammenfassenden Gegenüberstellung von F.-Trockenpulver und GÜ-Trockenpulver, sowie von Sup.-Trockenpulver und Hunger-Sup.-Trockenpulver kann festgestellt werden, daß die ersten beiden auf die Fettsäuresynthese aktivierend, die letzten beiden hemmend wirken. Nur das F.-Trockenpulver übertrifft in seiner Wirksamkeit den flüssigen Faktor bei vergleichbarer Konzentration bei weitem.

e. Bestimmung des ATP Gehalts im Trockenpulver und Abhängigkeit davon in Bezug auf die Fettsäuresynthese

ATP ist der Energielieferant für die verschiedensten Stoffwechselvorgänge im Organismus. In der Leber ist ATP der strukturerhaltende Stoff der Mitochondrien und greift somit in besonderem Maße in die einzelnen Atmungs- und Lebensvorgänge der Zelle ein. Die Hauptmenge der im ATP gespeicherten Energie stammt aus der biologischen Oxydation des Zitronensäure-Zyklus; sie wird frei bei der Verbrennung des Substrat-Wasserstoffs zu Wasser mit dem Sauerstoff der eingeatmeten Luft. Da die Fettsäuresynthese vor allem eine Stoffwechselarbeit der Leber ist, bei der hauptsächlich aufgespeicherte Energie benötigt wird, versuchte man als Erklärung für die aktivierenden Eigenschaften des Faktors ATP nachzuweisen. Dies gelang nicht - oder in zu geringem Maße - im flüssigen Faktor. Dagegen konnten in einigen F.-Trockenpulver-Präparaten geringe Mengen ATP nachgewiesen werden, die jedoch nie die erzielten Fettsäuresynthese-Steigerungen bewirken können.

Die Bestimmung von ATP im Supernatant, im Faktor und im F.-Trockenpulver wurde im Prinzip nach der von WARBURG inaugurierten und von LAMPRECHT modifizierten Methode durchgeführt:

Die Reaktion läuft in zwei Schritten ab:

I. $\text{ATP} + \text{Glukose} \xrightarrow{\text{Hexokinase}} \text{Glukose-6-phosphat} + \text{ADP}$
unter katalytischem Einfluß von Hexokinase wird die Glukose durch die Gegenwart von ATP zu Glukose-6-phosphat phosphoryliert, dabei entsteht das energieärmere ADP.

II. $\text{Glukose-6-phosphat} + \text{TPN} \xrightarrow{\text{Warburg Z.F.}} \text{6-Phosphogluconsäure} + \text{TPNH} + \text{H}$

In diesem II. Schritt dehydriert das Warburgsche Zwi-

schenferment das Glukose-6-phosphat zu 6-Phosphoglukonsäure. TPN dient als Wasserstoffakzeptor. Durch die quantitative Bestimmung des ebenfalls gebildeten TPNH im Photometer (Marke: Eppendorf) kann rückläufig auf den Gehalt an ATP geschlossen werden. Die Absorptionskurve des TPNH zeigt ihr Maximum bei 334 m μ . Die Menge des entstandenen TPNH kann durch Zunahme der Absorption verfolgt werden. Die Reaktion kommt zum Stillstand, sobald alles vorhandene ATP verbraucht ist.

Die folgenden zum Test benötigten Lösungen werden bei 0°C aufbewahrt und in eine Küvette von 2 cm Schichtdicke einpipettiert:

4,0 ml Tri-Äthanol-Puffer (=TRAP) von pH 7,4	
0,4 ml Glukose (0,5 m - Lösung)	
0,2 ml MgCl ₂ (0,1 m - Lösung)	
0,05 ml TNP-Lösung (=2mg in 0,1 ml aqua bidest.)	} **)*)
0,2 ml der auf ATP zu testenden Lösung *)	
*) Erklärung s.S.30	
**)*) erst unmittelbar vor Beginn des Testes einzupipettieren	

Die im Photometer gemessene Extinktion gilt als Ausgangswert t_0 . Werden nun 0,05 ml von der Fermentlösung auf einem Glasspatel hinzugegeben, so läuft die Reaktion ab (15 mg Hexokinase und 2 mg Warburg'sches Zwischenferment in 1,0 ml aqua bidestillata gelöst). Die Extinktionen werden jede 2.Minute gemessen ($t_1, t_3 \dots t_x$). Ist die Reaktion zum Stillstand gekommen, wird anschließend noch einmal 0,05 ml der Fermentlösung in die Küvette gegeben, um durch diesen "Nachstart" die Eigenextinktion der Fermentlösung zu

erhalten, die dann von der gemessenen Extinktionsdifferenz ($= t_0 - t_x$) subtrahiert wird. Die wirkliche Extinktionsdifferenz $= \Delta E$ kann zur Berechnung des absoluten ATP-Gehalts herangezogen werden, nach der Formel:

$$\Delta E \cdot 1,02 \cdot \text{Vol über} = \gamma_{\text{ATP/ml}} \quad \begin{array}{l} \text{der auszutestenden} \\ \text{Substanz} \end{array}$$

1,02 ist eine konstante Größe, die u.a. aus dem Molekulargewicht des ATP, der molaren Extinktion von ATP, dem Gesamtvolumen in der Küvette und deren Schichtdicke in cm errechnet wurde. Unter Vol über versteht man das Gesamtvolumen der enteweißten und neutralisierten Lösung in ml.

x) Zur Bestimmung des ATP-Gehaltes des F.-Trockenpulvers werden:

20 mg F.-Trockenpulver in 1,0 ml Puffer suspendiert, mit 1,0 ml eisgekühlter 0,6 n Perchlorsäure (HClO_4) enteweißt und anschließend 10 Minuten hochtourig bei 25000 xg/min. in der Kälte zentrifugiert. Das saure Zentrifugat wird dekantiert und durch tropfenweises Hinzufügen von 0,5 n KOH aus einer Bürette unter intensiver, ständiger Durchmischung bis auf einen pH.-Wert von 7,4 neutralisiert. Anschließend soll das Gemisch etwa 15 Minuten im Eisschrank stehen, bis sich das gebildete KClO_4 abgesetzt hat. Von dem Überstand können dann die zum Test benötigten 0,2 ml der auf ATP zu testenden Lösung abpipettiert werden. - Nach dem oben beschriebenen Ansatz wurde in folgendem Beispiel der ATP-Gehalt in 20 mg F.-Trockenpulver bestimmt:

20 mg F.-Trockenpulver in
1,0 ml Puffer und
1,0 ml HClO_4

1,060 ml KOH-Verbrauch zur
Neutralisation

$t_0 = 64$ Ausgangswert

$t_1 = 86$

$t_3 = 89$

$t_5 = 92$

$t_7 = 94$

$t_9 = 95$

$t_{11} = 99$

$t_{13} = \frac{99}{35}$ Differenz zwi-
schen t_0 u. t_{13}

-16 Nachstart-Eigen-
extinktion der
Fermentlösung

wirkliche Extinktionsdifferenz = 19 = ΔE

Logarithmisch läßt sich nach der Formel (s.S.30) der
Gehalt an ATP errechnen.

F = 00377

$\Delta E = 27875$

vol = 48572

76824

= 58,6 μ /20 mg F.-Trockenpulver

= 2,93 μ / 1 mg F.-Trockenpulver

(1 μ = 1 μ g)

Die Ausbeute aus 1,0 ml flüssigem Faktor beträgt et-
wa 100 mg F.-Trockenpulver (s.Zusammenstellung auf
S.23). Die ATP-Bestimmungen der einzelnen F.-Trocken-
pulverpräparationen ergaben variierende Werte, die
zwischen 0 und 30 μ pro 1 mg Trockenpulver schwankten.
Diese Menge ATP kann - den Versuchsansätzen als Rein-
substanz zugesetzt - nie den Grad der Synthesesteige-
rung erreichen, wie er durch Zusatz von F.-Trockenpul-
ver erzielt werden konnte, wie Parallelversuche gezeigt
haben.

Bei der Bestimmung des ATP-Gehaltes im Supernatant konnte interessanterweise festgestellt werden, daß die nachgewiesenen Mengen von ATP pro ml Supernatant bei den verschiedenen Versuchen nur eine relativ geringe Schwankungsbreite aufwiesen und die gefundenen Werte konstant zwischen 175 und 200 γ /ml lagen.

Die Höhe der Ausbeute bei der Fettsäuresynthese ist erstens von den zugeführten Faktoren und zweitens von der Inkubationsdauer abhängig.

Ad 1. Aus den graphischen Darstellungen (s. Anhang) wird durch die Gegenüberstellung von flüssigem Faktor und F.-Trockenpulver die Differenz über die Wirksamkeit im Bezug auf die Höhe der Fettsäuresynthese deutlich zugunsten des F.-Trockenpulvers sichtbar. Die Diagramme der beiden angefügten Versuche (Nr. 454 und 529) zeigen den ATP-Spiegel im Supernatant mit und ohne flüssige Faktor-Zugabe; bzw. mit und ohne F.-Trockenpulverzusatz. Die Abhängigkeit des ATP-Gehaltes von Faktorzufuhr respektive von F.-Trockenpulverbeigabe tritt bei den synthetisierten Fettsäuren in Erscheinung.

Ad 2. Ein Zusammenhang mit der Inkubationszeit und dem ATP-Gehalt ist gegeben. Bei beiden Versuchen (Nr. 454 u. 529) ist ein weiteres Ansteigen der gebildeten Fettsäuren nicht mehr zu erwarten, da während der dreistündigen Inkubation der ATP-Gehalt erschöpft und das Maximum der Synthese erreicht ist. (Die Behauptung wird erhärtet durch Versuche von 5- und 6-stündiger Inkubationsdauer.)

Bei beiden Versuchen wurde zu Beginn der Inkubation der "Nullwert" des ATP im Supernatant ermittelt, erst danach wurden entweder Faktor bzw. F.-Trockenpulver zu den einzelnen Versuchsansätzen zugesetzt. Es wurden stets zwei Warburgkölbchen, parallel laufend, das eine ohne, das andere mit

Faktor - und entsprechend im anderen Versuch, das eine Kölbchen ohne, das andere mit F.-Trockenpulver verschieden lang inkubiert. Nach einer 20', 40', 80', 120' und 180 Minuten andauernden Inkubation wurden stets zwei nebeneinanderlaufende Kölbchen der Warburg-Apparatur entnommen und der ATP-Gehalt der Lösung bestimmt. Nach dreistündiger Inkubation ist der ATP-Gehalt praktisch auf Null abgefallen. Interessant ist, daß der ATP-Gehalt nicht linear abfällt, sondern in den meisten Fällen zuerst ansteigt, nach ungefähr 80' ein Maximum erreicht, das bei F.-Trockenpulverzusatz besonders hoch ist. Aus den Kurven ist zu ersehen, daß mit steigender Fettsäuresynthese im Verlaufe der Inkubation der ATP-Gehalt abnimmt. Bei Faktorzusatz - flüssigem Faktor bzw. Faktortrockenpulver - verläuft die Kurve beachtlich anders, d.h. es resultiert ein steilerer Anstieg der Fettsäuresynthese und ein verzögerter Abfall der relativ höheren ATP-Werte.

D. Diskussion und Kritik der Versuchsergebnisse

Wie auch schon andere Autoren gezeigt haben, eignet sich das aus der Taubenleber präparierte Enzymsystem besonders zur Fettsäuresynthese, da es die Fettsäuresynthetisierenden Enzyme in optimaler Zusammensetzung enthält. Die präparierten Enzymsysteme zeigen beim Einsatz in die Versuche verständlicherweise unterschied-

liche Fettsäure-synthetisierende Aktivitäten. Dies ist durch die unterschiedliche physiologische Ausgangslage der Tiere erklärlich. Um möglichst gleichbleibende Versuchsbedingungen zu erhalten, muß darauf geachtet werden, daß die verwandte Taubenleber schon makroskopisch ein normales und kein pathologisches Aussehen zeigt. Es hat sich bei verschiedenen Versuchen erwiesen, daß Enzymsysteme aus ikterischen Lebern, Hepatomlebern und Metastasenlebern nicht die Fähigkeit haben, aus C^{14} -Acetat höhere Fettsäuren zu synthetisieren. Außerdem muß darauf geachtet werden, daß bei der Präparation des Enzymsystems die strikte Einhaltung der Temperatur von $0^{\circ}C$ zu befolgen ist. Sämtliche Lösungen sind ebenfalls im Eisschrank aufzubewahren. Ein geringer Überschuß an Puffer, nicht frisch zubereitete Lösungen oder ein pH-Wert $> 7,6$ beeinträchtigen oder hemmen die Synthesefähigkeit. - Das Absinken des pH-Wertes von 7,4 (oder 7,2) auf schwach saure Werte während der Inkubation ist erklärlich; die größte Ausbeute an Fettsäuren wurde bei einem pH-Wert von 6,9 (mit dem Beckmann-pH-Meßgerät) beobachtet.

Bei der Trockenpulverpräparation ist bei der Kältemischung auf die genaue Einhaltung des Eis : NaCl-Verhältnisses zu achten, da bei nicht genügend tiefer Temperatur nur eine zähe Masse entsteht, die selbst im Exsikkator nicht vollständig getrocknet werden kann.

Von den vier hergestellten Trockenpulverarten zeigt nur das "F.-Trockenpulver", das aus dem "flüssigen Faktor" dargestellt wird, eine verwertbare Fettsäuresynthesesteigerung. In 89 % der durchgeführten 95 Versuche zeigte das F.-Trockenpulver eine eindeutige Förderung der Synthese. In den restlichen 11 % wurde die Wirksamkeit des F.-Trockenpulvers durch gleichzeitig vorhandene, stärker hem-

mende Substanzen beeinträchtigt. In diesen 11 %, in denen die Menge der gebildeten Fettsäuren trotz der Anwesenheit des F.-Trockenpulvers in Höhe der Ausgangsaktivität - oder darunter - lag, war auch nicht das erforderliche Optimum von 30 mg F.-Trockenpulver/Versuchsansatz gewahrt, sondern es wurden entweder 7,5; 15; 20; 60; oder 115 mg pro Warburgkölbchen eingesetzt.

Außer als Aktivator der Fettsäuresynthese erwies sich das F.-Trockenpulver nützlich als Testsubstanz, da es über Monate haltbar bleibt und keine Einbuße seiner aktivierenden Fähigkeit erleidet. Wie schon oben angeführt, sind die einzelnen Fermentpräparationen hinsichtlich ihrer synthetisierenden Aktivität unterschiedlich, man kann deshalb durch Zusatz des gleichen F.-Trockenpulvers mit seiner aktivitätssteigernden Wirkung eine Aussage über die Qualität des Enzymsystems machen.

Von den übrigen drei präparierten Trockenpulverarten reicht das GÜ-Trockenpulver am ehesten in der Wirkung - wenn auch nicht vollkommen - an das F.-Trockenpulver heran.

Die Herstellung von "Sup.-Trockenpulver" ist nicht zufriedenstellend, da die Fettsäure-synthetisierende-Aktivität des flüssigen Supernatants durch den Trockenprozeß nicht erhalten werden kann; das präparierte Sup.-Trockenpulver hemmte die Synthese in fast allen Fällen. Dies ist vergleichbar mit der Fettsäure-synthetisierenden Aktivität eines Supernatants, der über 24 Stunden bei 0°C aufbewahrt war.

Aus Hungertaubenlebern läßt sich kein wirksamer Faktor präparieren; die Herstellung eines Hunger-Sup.-Trockenpulvers ist aus diesem Grunde unrentabel.

Von allen präparierten Trockenpulvern zeigt das Trockenpulver, das aus "flüssigem Faktor" hergestellt

wurde, die optimale Fettsäuresynthesesteigerung. Es wurden mit dem F.-Trockenpulver Synthesesteigerungen von 150 % - 200 %, je nach Ausgangswert, erzielt. Im Vergleich zu anderen die Fettsäuresynthese beeinflussenden Aktivatoren wie ATP, TPN, Mn, CoA u.a. steigert dieses F.-Trockenpulver die Ausbeute an markierten, synthetisierten Fettsäuren in unserem Enzymsystem maximal. - Bei der Verfolgung des Verhaltens von ATP im Verlaufe der Inkubation in unseren Versuchsansätzen zeigt sich bei F.-Trockenpulver-Zusatz ein charakteristisch anderer Verlauf. (Siehe Anhang: Bltt I und II). Unerwartet ergibt sich bei einem steileren Anstieg der Fettsäuresynthese nach F.-Trockenpulver-Zusatz ein vermehrter ATP-Gehalt, der dann auch einen verzögerten Abfall zeigt. Diese Beeinflussung des ATP-Gehalts (durch das F.-Trockenpulver) führt möglicherweise zur erhöhten Ausbeute der Fettsäuresynthese.

Die Hypothese, der flüssige Faktor oder das F.-Trockenpulver sei mit dem Biotin (Vitamin H) identisch, konnte bisher nicht bestätigt werden. Entsprechende Versuche zur Klärung dieser Frage sind im Gange.

Die Möglichkeit, aus dem Leberhomogenat mittels Ultrazentrifuge weitere aktivierende, bisher unbekannte Fraktionen zu isolieren, ist nicht ausgeschlossen.

Eine Übertragung der Ergebnisse der durchgeführten in vitro Versuche auf Verhältnisse in vivo bei Tieren wird vorbereitet. (z.B. Fütterung von Hungertauben mit F.-Trockenpulver).

Wenn man auch annehmen darf, daß im menschlichen Organismus die Fettsynthese ebenfalls von fördernden und hemmenden Faktoren beeinflusst wird, so sind Schlußfolgerungen aus den vorliegenden Versuchsergebnissen - eventuell zu therapeutischen Zwecken - doch nicht ohne weiteres möglich.

E. Zusammenfassung

Nach einem einführenden Überblick in die bisherige Forschung auf dem Gebiet der Biosynthese der Fettsäuren werden eigene experimentelle Versuche beschrieben. Der Einfluß von fördernden und hemmenden Faktoren auf die Fettsäuresynthese sowie ihre Präparation aus Taubenleberhomogenat wird dargestellt. Da die bisher verwandten flüssigen Taubenleberhomogenatsfraktionen nach kurzer Zeit erheblich in ihrer Wirkung nachließen, versuchten wir, die Eigenschaften der flüssigen Präparationen durch die Darstellung von Trockenpulvern zu fixieren.

Vier verschiedene Trockenpulverarten konnten wir durch Acetonfällung in der Kälte herstellen. Es sind dies:

- 1.) Faktortrockenpulver
- 2.) GÜ-Trockenpulver
- 3.) Supernatant-Trockenpulver
- 4.) Hungersupernatant-Trockenpulver.

Das Trockenpulver (1.) aus flüssigem Faktor präpariert, erwies sich als die optimalste Form einer die Fettsäuresynthese aktivierenden Substanz. Zugabe von Faktortrockenpulver zu den konstanten Versuchsansätzen ermöglichen eine Fettsäuresynthesesteigerung von 150 % - 200 %, je nach Aktivität des verwendeten Enzymsystems. Das Faktortrockenpulver ist fast unbegrenzt haltbar, genau dosierbar und übertrifft den "flüssigen Faktor" in seiner Wirkung bei weitem. Es kann daher über seine eigentliche, die Fettsäuresynthese aktivierende Aufgabe hinaus auch als stabile Testsubstanz für die Qualität eines präparierten Enzymsystems verwandt werden. Die Wirkung des Faktortrockenpulvers und Vergleiche mit dem flüssigen Faktor, sowie die Gegenüberstellung des ATP-Gehaltes

und der Höhe der Fettsäuresynthese der einzelnen Versuchsansätze mit und ohne Zusatz von Faktortrockenpulver werden diskutiert.

Die vom Faktortrockenpulver im Wirkungsmechanismus abweichenden, weniger rationell zu präparierenden anderen drei Trockenpulverarten werden ebenfalls beschrieben und ihre Eigenschaften erörtert.

M e i n a u f r i c h t i g e r D a n k

gilt Herrn Professor Dr. W. S e i t z ,
der mir im Isotopenlabor der Medizinischen
Universitätspoliklinik die experimentelle
Durchführung der vorliegenden Arbeit er-
möglichte,

Sowie in besonderem Maße
Freifrau Dr. Dr. v. R r a n d für die Anre-
gung zu diesen Untersuchungen und ihre stän-
dige Unterstützung durch wertvolle Hinweise
und Diskussionen.

Weiter danke ich der Deutschen Forschungs-
gemeinschaft für die zur Verfügung gestell-
ten Geräte.

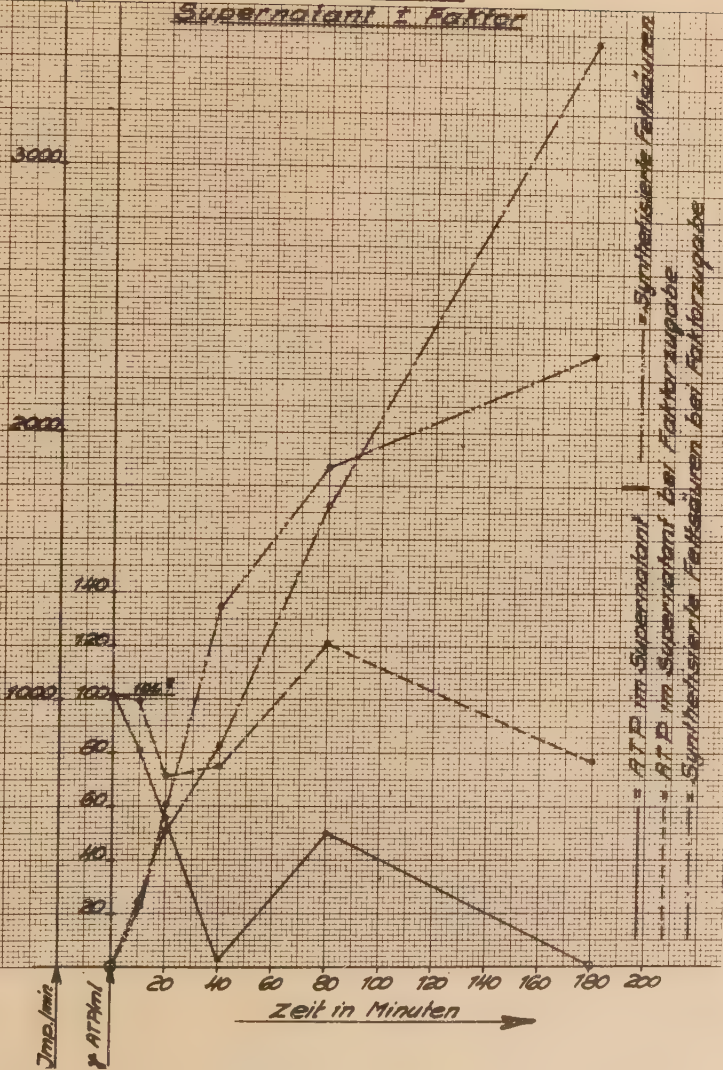
Den technischen Assistentinnen und meinen
Laborkollegen danke ich für die gute Zusam-
menarbeit.

F. Literaturangaben

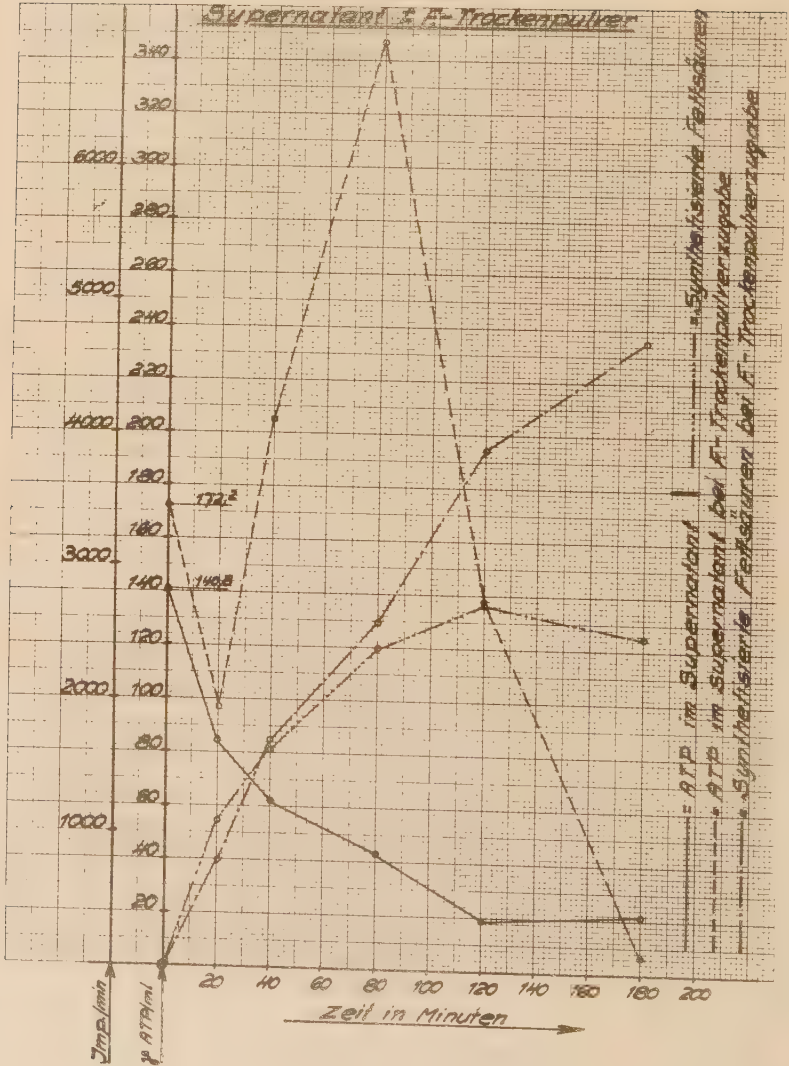
1. R.O. Brady, S. Guvin: J. Biol. Chem. 196, 421-431 (1952)
2. V.v. Brand, W. Seitz: Klin. Wschr. 36, 87-88 (1958)
3. E. Broda: Radioaktive Isotope i. d. Biochemie, Wien (1958)
4. G.N. Catravas, H.S. Anker: Proc. of the National
Academy of Sciences. 44, 1097-1099 (1958)
5. G.N. Catravas, H.S. Anker: J. Biol. Chem. 232, 669-680 (1958)
6. E. Dörner, W. Beier: Isotopen-Fibel f. d. Arzt,
Leipzig (1958)
7. E. Eichwald: Handbuch d. biol. Arbeitsmethoden
v. E. Abderhalden. Halle (1925)
8. St. Goldschmidt, H. Rehberg, V.v. Brand, K.H. Desing:
Chem. Ber. 90, 963-969 (1957)
9. F. D. Gunstone: An Introduction to the Chemistry of
Fats and Fatty Acids, New York (1958)
10. A. Hahn: Grundriß d. physiolog. Chemie f. Studier.,
Stuttgart (1946)
11. M. Hirsch: Die Trockentechnik, Berlin (1927)
12. J. Huber: Untersuchungen über d. spez. Fragen des
Trocknens. Nürnberg (1931)
13. E.P. Kennedy: Ann. Rev. Biochem. 26, 119-148 (1957)
14. W. Langenbeck: Lehrbuch d. organ. Chemie, Dresden (1958)
15. L. Leuthardt: Lehrbuch d. physiolog. Chemie, Berlin (1957)
16. F. Lynen, S. Ochoa: Biochim. Biophys. Acta, 12, 299-314
(1953)
17. F. Lynen: Angew. Chem. 67, 463 (1955)
18. H.J. Morbach: Diss., München (1959)
19. A. Murray, D.L. Williams: Organic Syntheses with
Isotopes, Part I, New York (1958)
20. K. Myrbäck: Enzymatische Katalase, Berlin (1953)
21. J.W. Porter, A. Tietz: Biochim. Biophys. Acta, 25, 41-50 (1957)
22. W. Seitz, V.v. Brand: Zschr. f. d. gesamt. Innere Medizin
u. ihre Grenzgebiete, 13, 764-767 (1958)
23. W. Seubert: Angew. Chem. 69, 359 (1957)
24. A. Tietz: Biochim. Biophys. Acta, 25, 303-310 (1957)
25. F. Wachsmann: Die radioaktiven Isotope ^{Dalp} Tasch' bü. Bd
26. O. Wieland: Klin. Wschr. 32, 385-392 (1954) München 1957
27. Schriftenreihe: Zum Thema: D. Fettstoffwechsel,
Deutsche Laerosan-Gesellschaft, Mannheim.

Versuch 454

Supernatant 2 Faktor



Versuch 529



L e b e n s l a u f

Am 6. Juli 1934 wurde ich, Dietrich Horst Rudolf K a s u l k e , als dritter Sohn des Pfarrers Karl Kasulke und seiner Ehefrau Elsa, geb. Prochnow in Bärwalde/ Pommern geboren.

In der Zeit von 1941 bis 1950 besuchte ich die Volksschulen in Bärwalde und Neustrelitz/Mecklenburg.

Von 1950 bis 1953 war ich Schüler der Clara-Zetkin-Oberschule in Neustrelitz. - Im Jahre 1955 legte ich am Staatlich Naturwissenschaftlichen Gymnasium in Landau in der Pfalz die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester des gleichen Jahres begann ich mit dem Studium der Medizin an der Universität München, wo ich 1957 das Physikum bestand und am 17.12.60 das medizinische Staatsexamen abgelegt habe.
